

# Best Available Copy

1/19/1 Links

Derwent WPI

(c) 2005 Thomson Derwent. All rights reserved.

013566667

WPI Acc No: 2001-050874/200107

XRAM Acc No: C01-014233

- Treating carbohydrate metabolism disorders, especially diabetes, comprises activating insulin-secreting b-cells using glucagon-related peptide, glucose-dependent insulinotropic polypeptide, exendin-4 or related drugs

Patent Assignee: HOERSCH D (HOER-I)

Inventor: HOERSCH D

Number of Countries: 001 Number of Patents: 001

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
DE 19921537	A1	20001123	DE 1021537	A	19990511	200107 B

Priority Applications (No Type Date): DE 1021537 A 19990511

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan Pg	Main IPC	Filing Notes
DE 19921537	A1	10	A61K-038/22	

Abstract (Basic): DE 19921537 A1

NOVELTY - Treating carbohydrate metabolism disorders, by activation of PKB/Akt in insulin-secreting beta-cells comprises administration of glucagon-related peptide (GLP-1), glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) or exendin-4, their derivatives or agonists, receptor or signal transduction cascade agonists, GLP-1 or GIP endogenous synthesis or release stimulants and corresponding salts.

DETAILED DESCRIPTION - INDEPENDENT CLAIMS are also included for the following:

(1) use of a pharmaceutical composition containing GLP-1, GIP or exendin-4 (or their agonists or derivatives) for inducing the proliferation of insulin-secreting beta-cells and inhibiting their premature programmed cell death; and

(2) isolating beta-cell-specific activation effectors for PKB/Akt comprising measuring the proliferative or anti-apoptosis activity of drugs in cell proliferation studies (specifically using INS-1, HIT, beta-TC or RINmF5 cells, especially isolated islet cells).

ACTIVITY - Antidiabetic.

No supporting biological data given

MECHANISM OF ACTION - Protein kinase activator; insulin-secreting beta-cells proliferation activator.

INS-1 cells were cultured ('starved') overnight in serum-free RPMI medium then stimulated for 10 minutes using insulin or IGF-1 or for 360 minutes using GLP-1. Half-maximum activation was obtained using GLP1 at a concentration of 10 nM, compared with 50 nM for insulin and 1 nM for IGF-1.

USE - For treating diabetes mellitus type I or II, MODY, gestational diabetes or secondary diabetes (all claimed). The method may be used in the disturbed glucose tolerance stage or in the insulin resistance state after surgical intervention or myocardial infarction (claimed).

pp; 10 DwgNo 0/4

Title Terms: TREAT; CARBOHYDRATE; METABOLISM; DISORDER; DIABETES; COMPRISE;

ACTIVATE; INSULIN; SECRETION; CELL; GLUCAGON; RELATED; PEPTIDE; GLUCOSE;  
DEPEND; POLYPEPTIDE; RELATED; DRUG

Derwent Class: B04; D16

International Patent Class (Main): A61K-038/22

International Patent Class (Additional): A61K-038/26

File Segment: CPI

Manual Codes (CPI/A-N): B04-N02; B14-S04; D05-H09

Chemical Fragment Codes (M1):

\*01\* M423 M781 M905 P816 Q233 RA00H3-K RA00H3-T RA00H3-U  
\*02\* D011 D601 F011 F012 F014 F019 F423 F499 F521 G010 G019 G100 H1 H101  
H183 H2 H213 H4 H405 H484 H5 H598 H8 H9 J0 J014 J1 J173 J3 J312 J373  
K0 L2 L250 M210 M211 M271 M281 M311 M312 M313 M314 M315 M322 M323  
M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349 M371 M381 M393 M423 M511 M523  
M532 M540 M781 M904 M905 P816 Q233 RA002G-K RA002G-T RA002G-U  
\*03\* D011 D601 F014 F019 F521 F599 G010 G013 G019 G100 H1 H101 H183 H4  
H405 H441 H484 H8 J0 J014 J1 J173 J3 J373 K0 L2 L250 L299 M280 M311  
M312 M313 M314 M315 M322 M323 M331 M332 M333 M340 M342 M343 M349  
M371 M381 M393 M423 M511 M522 M533 M540 M781 M904 M905 P816 Q233  
RA0B8N-K RA0B8N-T RA0B8N-U

Specific Compound Numbers: RA00H3-K; RA00H3-T; RA00H3-U; RA002G-K; RA002G-T  
; RA002G-U; RA0B8N-K; RA0B8N-T; RA0B8N-U

Key Word Indexing Terms:

\*01\* 184616-0-0-0-CL, USE 94827-0-0-0-CL, USE 96186-1-0-0-CL, USE



⑯ BUNDESREPUBLIK

DEUTSCHLAND



DEUTSCHES

PATENT- UND  
MARKENAMT

# Offenlegungsschrift

⑯ DE 199 21 537 A 1

⑯ Int. Cl.<sup>7</sup>:

A 61 K 38/22

A 61 K 38/26

DE 199 21 537 A 1

⑯ Aktenzeichen: 199 21 537.5

⑯ Anmeldetag: 11. 5. 1999

⑯ Offenlegungstag: 23. 11. 2000

⑯ Anmelder:

Hörsch, Dieter, Dr.med., 35043 Marburg, DE

⑯ Erfinder:

gleich Anmelder

⑯ Entgegenhaltungen:

WO 99 44 598 A2

WO 99 06 059 A2

WO 00 07 617 A1

Edvell,A. und Lindstrom,P.: "Initiation of Increased Pancreatic Islet Growth in Young Normoglycemic Mice (Umeå +/?)" . In: Endocrinology 1999, 140 (2), S.778-783;

## Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑯ Verfahren zur Induzierung von Zellwachstum durch Verwendung geeigneter Mittel

⑯ Die Erfindung betrifft eine Methode zur Therapie von Störungen des Kohlehydratstoffwechsels durch Verbesserung der zellulären Funktion der insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen durch Induzierung der Proliferation und Verhinderung ihres vorzeitigen programmierten Zelltodes um dadurch die Menge des körpereigenen Insulins zu erhöhen, das bei erhöhten Blutzuckerspiegeln ausgeschüttet werden kann. Eine bevorzugte Methode betrifft die Verabreichung von Effektoren, die die Proteinkinase B/Akt in den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen aktivieren. Bevorzugte Effektoren beinhalten GLP-1, GIP, Exendin-4 oder Agonisten des GLP-1 Rezeptors, Agonisten des GIP-Rezeptors und ihre pharmakologischen Salze und Derivate. Ferner beschreibt die Erfindung eine Methode Substanzen zu isolieren, die durch Aktivierung der PKB/Akt auf insulinsezernierende Zellen wachstumsfördernd wirken und einen vorzeitigen Zelltod verhindern.

DE 199 21 537 A 1



## Beschreibung

## 1. Kurzfassung

Die Erfindung betrifft die Anwendung von Verfahren zur Therapie des Diabetes mellitus, bei denen es durch die Verabreichung von GLP-1, GIP oder analog wirkenden Substanzen zur spezifischen Aktivierung der Serin-Threoninkinase Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt) in insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse kommt. In Folge der Verabreichung von PKB/Akt-Aktivierungseffektoren wird eine Verbesserung der zellulären Funktion durch eine Verhinderung des Zelltodes und eine Steigerung der Proliferation von insulinsezernierenden Zellen erreicht. Dadurch erhöht sich die Menge des körpereigenen Insulins und des C-Peptids, das bei erhöhtem Blutzuckerspiegel ausgeschüttet werden kann, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht. Ferner beschreibt die Erfindung eine Methode Substanzen zu isolieren, die durch Aktivierung der PKB/Akt auf insulinsezernierende Zellen wachstumsfördernd wirken und einen vorzeitigen Zelltod verhindern.

## 2. Stand der Technik

## Problemstellung

Bei der Therapie des Diabetes mellitus Typ II kommen hauptsächlich Verfahren zur Anwendung, die die Insulinsekretion aus insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen der Bauchspeicheldrüse erhöhen (z. B. Sulfonylharnstoffe wie Glipenclamid), die Glukoseaufnahme in die insulininsensitiven Gewebe erleichtern (z. B. Biguanide wie Metformin) oder die Anflutung von Glukose im Blut nach Nahrungsaufnahme vermindern (z. B.  $\alpha$ -Glukosidaseinhibitoren wie Acarbose). Diese Therapieformen können jedoch in der Regel die Phase des absoluten Insulinmangels nicht verhindern sondern nur verzögern und können den Untergang der insulinproduzierenden Zellen nicht verhindern sondern höchstens verzögern (Clark et al. Diabetes Res Clin Pract 28 Suppl (1995) S. 39–47, Cicutan et al: Diabetes Metab 23 Suppl 3 (1997) 25–28 und C. R. Kahn in Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, Second Edition, K.L. Becker Ed (J.B. Lippincott Company, Philadelphia, (1995), 1198–1202, 1210–1216).

Eine andere therapeutische Möglichkeit zur Behandlung des Diabetes mellitus besteht in der pharmakologischen Anwendung des Inkretineffektes (Ebert und Creutzfeld Diab Met Rev 3 (1987) 1–16 und Dupre in The Endocrine Pancreas, E. Samols, Ed (Raven Press, New York, ( 1991) 253–281)). Nach oraler Aufnahme einer bestimmten Kalorienmenge kommt es zu einem höheren Anstieg des Insulins im Plasma als nach parenteraler Verabreichung der gleichen Kalorienmenge. Diese hormonelle Wirkung wurde als Inkretineffekt bezeichnet (Ebert und Creutzfeld, vide sura, und Fehmann et al. Endocrine Rev 16 (1995) 390–410). Die Peptidhormone Glucose-dependent insulinotropic polypeptide (GIP) und Glucagon-related peptide-1 (GLP-1) wurden als Haupt-Inkretinhormone charakterisiert (Fehmann et al. vide sura). Im folgenden sind in der Bezeichnung GLP-1 und GIP alle bioaktiven Formen von GLP-1 und GIP und ihrer Analoge mit insulinotropen Wirkungen enthalten. Alternativ werden die bioaktiven Formen von GLP-1 und GIP als Insulinotrope bezeichnet. GLP-1 und GIP werden nach Nahrungsaufnahme aus endokrinen Zellen des Darms freigesetzt und bewirken eine Insulinfreisetzung aus den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen des endokrinen Pankreas in Abhängigkeit vom Glukosespiegel im Plasma (Fehmann et al. vide

sura und Volz et al. vide sura). Die Rezeptoren für GIP und GLP-1 wurden auf insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen nachgewiesen. Nach Bindung von GLP-1 und GIP an ihre Rezeptoren kommt es zu einem Anstieg des intrazellulären zyklischen Adenosinmonophosphat und dadurch über die Erhöhung des intrazellulären Calciums zu einer erleichterten Insulinsekretion (Fehmann et al. vide sura, Volz et al. vide sura und Thorens in WO 9319175 und WO 9625487).

Die pharmakologische Verabreichung von GLP-1 zur Behandlung des Diabetes mellitus wird wegen der insulinotropen Wirkung dieses Peptides als erfolgversprechender Therapieansatz angesehen (zum Beispiel Habener et al. WO 9325579). Eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung von GLP-1 auf die insulinsezernierenden Zellen ist jedoch in WO 9325579 nicht beschrieben.

Modifikationen von GLP-1 zum Beispiel durch lipophile Substitutionen einzelner Aminosäuren (Knudsen et al. WO 9808871) oder durch parenterale Applikation mittels Iontoporesis (Glenn et al. WO 9325579) oder buccale Aufnahme der insulinotropen Wirksubstanzen (Gutniak et al. US 5863555) zielen darauf ab, den insulinfreisetzenden Effekt von GLP-1 an den pankreatischen  $\beta$ -Zellen zu verstärken. Durch den Einsatz des langwirksamen Exendin-Analogen von GLP-1 (Hoffmann et al. WO 97/46584) soll ebenfalls eine therapeutische wirksame Insulinfreisetzung an den  $\beta$ -Zellen verursacht werden. Die hier aufgeführten Patentschriften beschreiben jedoch lediglich die insulinotropen Wirkungen von GLP-1 oder GLP-1 Analogien oder GLP-1 Derivaten. Eine proliferative und anti-apoptotische Wirkung von GLP-1 auf die insulinsezernierenden Zellen ist jedoch weder in WO 9808871, noch in WO 9325579, US 5863555, oder WO 97/46584 beschrieben.

Eine Therapie mittels GLP-1 oder Analogien, die darauf abzielt die katabolen Wirkungen nach Myokardinfarkt (Efendic WO 9808531) oder chirurgischen Eingriffen (WO 9808873) durch Insulinfreisetzung günstig zu beeinflussen, wurden ebenfalls beschrieben. Auch hier werden weder proliferative noch antiapoptotische Wirkungen von GLP-1 beschrieben.

Um den Untergang der insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen beim Diabetes mellitus entgegenzuwirken, werden verschiedene Strategien experimentell angewandt, die darauf zielen, die Menge an insulinsezernierenden Zellen zu erhöhen. Die internationale Patentschrift WO 98/27210 (Jaspers et al.) beschreibt ein Verfahren, das durch die Verabreichung eines Insulin-Homologs die Menge an körpereigenen  $\beta$ -Zellen erhöht. Thorens beschreibt in WO 9625487 die Gabe von gentechnologisch hergestellten Zelllinien, die durch die Kopplung der Insulinsekretion an eine erfolgte Stimulation des GLP-1- oder des GIP-Rezeptors dem Insulinmangel beim Diabetes mellitus entgegenwirken. Einen ähnlichen therapeutischen Weg durch die Anwendung sehr aufwendiger gentechnologischer Mittel beschreiben Soon-Shiong et al. in WO 9749728. Diese Verfahren sind jedoch insgesamt sehr aufwendig und weit von einer klinischen Anwendung entfernt.

Die Proteinkinase B/Akt (PKB/Akt) ist eine ubiquitär exprimierte Serin-Threonin Kinase, die in drei Isoformen vorkommt (PKB $\alpha$ /Akt1, PKB $\beta$ /Akt2, PKB $\gamma$ /Akt3; Coffer et al. Biochem. J. 335 (1998) 1–13). Die Bedeutung der PKB/Akt für die Proliferation und Verhinderung des programmierten Zelltodes konnte für viele zelluläre Systeme nachgewiesen werden (Coffer et al. vide sura). Die PKB/Akt kann durch Rezeptortyrosinkinasen für Wachstumsfaktoren oder durch G-Protein gekoppelte Rezeptoren aktiviert werden (Murga et al. J.

Biol. Chem. 273 (1998) 19080–19085). Dadurch eignet sich die PKB/Akt in besonderer Weise als ein pharmakolo-

gischer Angriffspunkt um die Funktion zellulärer Systeme durch Erhöhung der proliferativen Aktivität und Verhindern des vorzeitigen Zelltodes zu verbessern wie es Roenholm et al. in WO 9901151 für eine Behandlung des insulinresistenten Herzmuskels mit Wachstumshormonpräparaten beschreiben.

### Lösung

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, durch die Verabreichung einer pharmakologisch aktiven Substanz die zelluläre Funktion insulinsezernierender  $\beta$ -Zellen zu verbessern indem durch die Aktivierung der PKB/Akt diese zum Wachstum angeregt werden und ihr frühzeitiger programmiert Zelltod verhindert wird, um dadurch die Phase des relativen und absoluten Insulinmangels bei der Therapie des Diabetes mellitus zu verhindern. Die Substanz soll über einen auf den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen lokализierten Rezeptor wirken und durch die Vermittlung des durch die Ligandenbindung aktivierten Rezeptors intrazelluläre Signalkaskadenmoleküle aktivieren, die proliferativ und anti-apoptotisch wirken. Um eine spezifische Wirkung an den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen zu erreichen, soll die pharmakologisch aktive Substanz an Rezeptoren binden, die vor allem auf insulinsezernierenden Zellen exprimiert werden.

### 3. Beschreibung des Verfahrens

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß dadurch gelöst, dass eine effektive Dosis von GLP-1, GIP, Exendin oder deren Analogen verabreicht wird. Dadurch werden die, auf den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen befindlichen, Rezeptoren für GLP-1 oder GIP aktiviert, die wiederum die intrazelluläre Kinase PKB/Akt aktivieren. Als Folge dieser PKB/Akt Aktivierung kommt es zu einer Proliferation der insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen und zu einer Verhinderung des frühzeitigen, durch die diabetische Stoffwechsellage ausgelösten, programmierten Zelltod der insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen. Dadurch erhöht sich die Mengen des körpereigenen Insulins und des C-Peptids, das bei erhöhter Blutzuckerspiegeln ausgeschüttet werden kann, was eine Stimulierung des Kohlehydratstoffwechsels des behandelten Organismus nach sich zieht.

In einer Ausbildung der Methode wird GLP-1 in einer Dosis von 1 bis 50 picomol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht oder in einer Dosis von 0,1 bis 50 nanomol/kg Körpergewicht/Minute subkutan.

Nach einer anderen Ausbildung der Methode wird GIP in einer Dosierung von 1 bis 50 picomol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht oder in einer Dosis von 0,1 bis 50 nanomol/kg Körpergewicht/Minute subkutan.

Eine weitere Ausbildung der Methode besteht darin, dass Exendin-4 in einer Dosierung von 50 bis 500 nanomol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht wird oder in einer Dosis von 5 bis 500 mikromol/kg Körpergewicht/Minute subkutan.

In einer weiteren Ausbildung der Methode werden pharmakologisch aktive Substanzen mit agonistischer Wirkung am GLP-1 Rezeptor oder am GIP Rezeptor in einer Dosis verabreicht, die die GLP-1- und GIP-Rezeptoren so aktivieren, dass dadurch die PKB/Akt aktiviert wird. Die agonistisch wirkenden Substanzen am GLP-1- oder GIP-Rezeptor können peptidige Agonisten oder nicht peptidige Agonisten sein und intravenös, subkutan, intramuskulär, transdermal, oral, buccal oder sublingual verabreicht werden. Weiterhin ist die Verabreichungsform bei oraler Gabe eine Tablette, eine Pille, ein Dragee, eine Kapsel oder ein Granulum.

In einer besonders vorteilhaften Form der Ausbildung der Methode wird GLP-1 oder eine Substanz mit agonistischer Wirkung am GLP-1 Rezeptor und GIP oder eine Substanz mit agonistischer Wirkung am GIP Rezeptor zusammen verabreicht. Die Kombinationsbehandlung kann auch aus der Verabreichung von Exendin-4 oder einer analog wirkenden Substanz zusammen mit GIP oder einer Substanz mit agonistischer Wirkung am GIP-Rezeptor bestehen.

Die erfindungsgemäße Ausbildung der Methode kann angewandt werden bei allen primären Formen des Diabetes mellitus (Diabetes mellitus Typ 1 und 2, MODY-Formen des Diabetes) und bei sekundären Formen des Diabetes mellitus. Eine weitere besonders vorteilhafte Ausbildung der Methode besteht in der Anwendung bei Vorstufen des Diabetes mellitus Typ 1 und 2 insbesondere im Stadium der eingeschränkten Glukosetoleranz.

Eine Weiterentwicklung der erfindungsgemäßen Methode besteht in der Etablierung eines Versuchsansatzes zur Isolierung von Substanzen, die auf insulinsezernierende  $\beta$ -Zellen wachstumsfördernd wirken und einen programmierten Zelltod verhindern. Zellen, die weitgehend den insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen in ihren physiologischen und pathophysiologischen Eigenschaften entsprechen, werden kultiviert und mit pharmakologischen Substanzen bei verschiedenen Glukosekonzentrationen inkubiert. Die proliferative Aktivität wird durch den Einbau von  $^3$ H-Thymidin oder durch Umwandlung eines Tetrazoliumfarbstoffes (Carmichel et al. Cancer Res. 47 (1987) 943–946) gemessen. Proliferativ aktive Substanzen werden nachfolgend durch den Vergleich in anderen Zellsystemen auf die Spezifität der Proliferationsinduktion getestet. Die Wirkung auf die PKB/Akt wird in einem Immunoblot mit aktivierungsspezifischen Antikörpern (New England Biolabs), durch Gelschift oder in einem Akt assay (Coffer et al. vide supra) bestimmt.

In einer Ausbildung der Methode sind die Zellen INS-1 Zellen, HIT-Zellen,  $\beta$ -TC-Zellen oder RINmF5-Zellen (Asfari et al. Endocrinology 130 (1992) 167–178). Eine weitere besonders vorteilhafte Ausbildung der Methode besteht in der Verwendung isolierter Insel-Zellen aus Säugetieren, vorzugsweise aus Ratten oder Schweinen (Lacy et al. Diabetes 16 (1967) 39ff).

Eine weitere Ausbildung der Methode besteht in der Bestimmung der anti-apoptotischen Wirkung von pharmakologischen Substanzen durch die Kultivierung von Insel-Zellen oder  $\beta$ -Zelllinien wie oben beschrieben ohne Serum im Zell-Kulturmedium. Unter diesen Bedingungen untergehen die Insel-Zellen in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration im Zell-Kulturmedium nach 24 h bis 48 h einem programmierten Zelltod, der durch verschiedene Verfahren wie zum Beispiel dem Nucleosomenassay oder der DNA-Fragmentierung (siehe Katalog Roche Molecular Biochemicals 1999 Biochemicals Catalog Seite 254–281) bestimmt werden kann. Durch den Zusatz von pharmakologischen Substanzen in den Versuchsansatz kann die anti-apoptotische Wirkung ermittelt werden.

### 4. Vorteile und Neuheiten des Verfahrens

Besonders vorteilhaft ist bei dem beschriebenen Verfahren, dass durch die Gabe von pharmakologisch aktiven Substanzen ein Wachstum und ein Schutz vor einem frühzeitigen programmierten Zelltod der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen erreicht wird. Dadurch unterscheidet sich die Methode wesentlich von anderen therapeutischen Methoden in der Behandlung des Diabetes mellitus. Die etablierten therapeutischen Verfahren in der Behandlung der diabetischen Stoffwechsellage beinhalten eine Steigerung der Insulingabe, eine Verbesserung der Glukoseaufnahme in die



Zelle, eine Hemmung der Glukoneogenese in der Leber, eine Verminderung der Resorbition von Kohlehydraten und die Gabe von Insulin in verschiedenen pharmakologischen Zubereitungen (C.R. Kahn in Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism, Second Edition; K.L. Becker Ed (J.B. Lipincott Company, Philadelphia, (1995), 1198-1202, 1210-1216; Clark et al. Diabetes Res Clin Pract 28 Suppl (1995) S39-47 und Coutant et al. Diabetes Metab 23 Suppl 3 (1997) 25-28). Durch die gezielte pharmakologische Induzierung einer gesteigerten Proliferation und einer Verhinderung des frühzeitigen programmierten Zelltodes der insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen kann die Menge des körpereigenen Insulins erhöht werden. Dadurch wird die diabetische Stoffwechsellage günstig beeinflusst. Die besondere Situation, dass auf den insulinproduzierenden Zellen G-Protein gekoppelte Rezeptoren der Inkretinhormone GIP und GLP-1 exprimiert werden, die nach Ligandenbindung bei erhöhten Glukosekonzentrationen eine erhöhten Aktivierungsgrad der PKB/Akt bewirken, ist besonders vorteilhaft für ihre pharmakologische Beeinflussung. Die hier dargestellten Verfahren stellen zum ersten Mal eine Methode dar, bei der es durch die Aktivierung der GLP-1- und GIP-Rezeptoren auf den insulinproduzierenden Zellen durch die Aktivierung der PKB/Akt zu einer Steigerung der Proliferation und zu einem Schutz vor einem frühzeitigen programmierten Zelltod kommt. In einer Weiterentwicklung der Methode werden Verfahren dargestellt, die es erlauben gezielt extra- und intrazelluläre Effektoren für eine Aktivierung der PKB/Akt in insulinproduzierenden Zellen zu isolieren.

### 5. Anwendungsbeispiele

#### 5.1 Metabolische Aktivität in der $\beta$ -Zell-Linie INS-1 nach Stimulierung mit Insulin, IGF-1 und GLP-1

INS-1 Zellen (Asfari et al. vide sura; Passage 80-110) wurden in 96 well Cell-Kulturschalen in RPMI 1640 Medium (Gibco) mit 10% Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, FRG) kultiviert. Nach einer Hungerphase von 24 h in RPMI 1640 ohne Kälberserum wurden die Zellen bei verschiedenen Glukosekonzentrationen mit GLP-1 (100 nM; Bachem, Bubendorf, CH), IGF-1 (10 nM; Bachem) und Insulin (100 nM; Huminsulin Hoechst) für 20 h stimuliert. Die metabolische Aktivität als Maß der Zell-Proliferation wurde mit einem Tetrazoliumfarbstoff (EZ4U, Biomedica, Wien, A) bestimmt. Der Farbstoff wurde für 6 h in dem Stimulationsmedium belassen und danach wurde die Extinktion bei 450 nm in einem ELISA-Reader bestimmt. Die Stimulation mit 100 nM GLP-1 führte zu einer glukoseabhängigen Proliferation der INS-1 Zellen, die bei 10 mM Glukose mit 31% und bei 15 mM mit 41% circa doppelt so hoch war wie bei einer alleinigen Stimulation mit 10 mM Glukose (13%) und 15 mM Glukose (23,5%). Dabei lag die Stimulation durch GLP-1 auf die metabolische Aktivität ungefähr gleich hoch wie bei einer Stimulation mit 100 nM Insulin und 10 nM IGF-1 (Abb. 1). Die proliferative Aktivität wurde als prozentuale Relation im Vergleich zu einer Stimulation der Zellen mit 10 mM Glukose und 10% Kälberserum bestimmt.

#### 5.2 Bestimmung der PKB/Akt Aktivierung durch GLP-1

INS-1 Zellen wurden kultiviert wie oben beschrieben. Die Zellen wurden über Nacht in RPMI 1640 Medium ohne Serumzusatz gehunbert. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit GLP-1, Insulin und IGF-1. Zur Bestimmung des Zeitverlaufes der PKB/Akt Aktivierung wurden die Zellen bei 10 mM Glukose mit GLP-1, Insulin und IGF-1 in einer Konzentration von 10 nmol zwischen 3 und 360 Minuten stimu-

liert. Die Zellen wurden lysiert und 100- $\mu$ g Protein wurden auf mit einem 7%igen SDS-PAGE Gel aufgetrennt, auf Nitrozellulose Membranen transferiert und die aktivierte PKB/Akt wurde mit einem phospho-spezifischen Antikörper gegen pSer473 der PKB $\alpha$ /Akt1 nachgewiesen. Ein Immunoblot für die Gesamtform der PKB/Akt diente als Kontrolle (New England Biolabs). Das Maximum der PKB/Akt Aktivierung durch GLP-1 lag bei 360 Minuten (Abb. 2A) während Insulin (Abb. 2B) und IGF-1 (Abb. 2C) die PKB/Akt 10 zwischen 3 und 30 Minuten maximal stimulierten.

Um die Dosis-Wirkungskurve von GLP-1 im Vergleich zu Insulin und IGF-1 zu bestimmen, wurden INS-1 Zellen über Nacht in RPMI Medium ohne Serumzusatz gehunbert und danach für 10 Minuten (Insulin und IGF-1) beziehungsweise 360 Minuten (GLP-1) stimuliert. GLP-1 führte zu einer halbmaximalen Aktivierung in einer Konzentration von 10 nM (Abb. 3A) während die halbmaximale Stimulation für Insulin bei 50 nM (Abb. 3B) und für IGF-1 bei 1 nM (Abb. 3C) lag. Die Bestimmung der PKB/Akt Aktivität 15 wurde durchgeführt wie oben beschrieben.

Die Glukoseabhängigkeit der PKB/Akt Aktivierung wurde durch Stimulation mit 10 nM GLP-1 (60 Minuten) und 10 nM Insulin und 10 nM IGF-1 (jeweils 10 Minuten) bestimmt (Abb. 4). Die Messung der PKB/Akt Aktivierung 20 wurde durchgeführt wie oben beschrieben. Der Grad der PKB/Akt Aktivierung konnte durch eine Steigerung des Glukosezusatzes im Medium erhöht werden. Dabei zeigte sich auch eine Erhöhung der PKB/Akt Aktivierung durch GLP-1, Insulin und IGF-1 bei supraphysiologischen Gluko- 25 sekonzentrationen (Abb. 4).

### 8. Erläuterungen zu den Abbildungen

**Abb. 1:** Bestimmung der metabolischen Aktivität in der 35  $\beta$ -Zell-Linie INS-1 bei verschiedenen Glukosekonzentrationen und nach Stimulierung mit 10 nM IGF-1 und 100 nM Insulin und IGF-1. Der Grad der metabolischen Aktivierung ist als prozentuale Relation im Vergleich zur metabolischen Aktivität bei 10 mM Glukose und 10% Kälberserum im Stimulationsmedium angegeben. Ergebnisse aus 12 unabhängigen Versuchen.

**Abb. 2:** Zeitverlauf der ProteinkinaseB/Akt Aktivierung 45 in der der  $\beta$ -Zell-Linie INS-1 durch GLP-1 (A), Insulin (B) und IGF-1 (C). INS-1 Zellen wurden über Nacht in RPMI 1640 Medium gehunbert und mit 10 nM GLP-1, Insulin und IGF-1 stimuliert. Die Aktivierung der PKB/Akt wurde durch Auftrennung der Proteine in einem 7%igen SDS-Page Gel und nachfolgenden Immunoblot mit einem aktivierungsspezifischen Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 473 der PKB $\alpha$ /Akt1 (New England Biolabs) nachgewiesen. Ergebnisse aus 3-5 Versuchen.

**Abb. 3:** Dosis-Wirkungskurve der PKB/Akt Aktivierung 55 in der der  $\beta$ -Zell-Linie INS-1 durch GLP-1 (A), Insulin (B) und IGF-1 (C). INS-1 Zellen wurden über Nacht in RPMI 1640 Medium gehunbert und mit verschiedenen Konzentrationen von GLP-1, Insulin und IGF-1 stimuliert. Die Aktivierung der PKB/Akt wurde durch Auftrennung der Proteine in einem 7%igen SDS-Page Gel und nachfolgenden Immunoblot mit einem aktivierungsspezifischen Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 473 der PKB $\alpha$ /Akt1 (New England Biolabs) nachgewiesen. Ergebnisse aus 3-6 Versuchen.

**Abb. 4:** Glukoseabhängigkeit der ProteinkinaseB/Akt Aktivierung in der der  $\beta$ -Zell-Linie INS-1 durch GLP-1 (A), 65 Insulin (B) und IGF-1 (C). INS-1 Zellen wurden über Nacht in RPMI 1640 Medium gehunbert und bei verschiedenen Glukosekonzentrationen mit 10 nM GLP-1, Insulin und IGF-1 stimuliert. Die Aktivierung der PKB/Akt wurde



durch Auf trennung der Proteine in einem 7%igen SDS-PAGE Gel und nachfolgenden Immunoblot mit einem aktivierungsspezifischen Antikörper gegen das phosphorylierte Serin 473 der PKB $\alpha$ /Akt1 (New England Biolabs) nachgewiesen. Ergebnisse aus 3–6 Versuchen.

5

## Patentansprüche

1. Die Verwendung eines pharmazeutischen Mittels, das GLP-1, einen GLP-1 Agonisten oder ein GLP-1 10 Derivat enthält, um die insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen zur Proliferation anzuregen und ihren vorzeitigen programmierten Zelltod zu verhindern.
2. Die Verwendung eines pharmazeutischen Mittels, das GIP, einen GIP Agonisten oder ein GIP Derivat 15 enthält, um die insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen zur Proliferation anzuregen und ihren vorzeitigen programmierten Zelltod zu verhindern.
3. Den Gebrauch eines pharmazeutischen Mittels, das Exendin-4, einen Exendin-4 Agonisten oder ein Exendin-4 Derivat enthält, um die insulinsezernierenden  $\beta$ -Zellen zur Proliferation anzuregen und ihren vorzeitigen programmierten Zelltod zu verhindern.
4. Eine Methode Zustände mit gestörtem Kohlehydratstoffwechsel durch Aktivierung der PKB/Akt in insulinproduzierenden  $\beta$ -Zellen zu behandeln, indem ein pharmazeutisches Mittel, bestehend aus GLP-1, GLP-1 Agonisten, GLP-1 Derivaten, Agonisten des GLP-1 Rezeptors, Agonisten der GLP-1 Signal Transduktionskaskade, Mittel, die die Synthese endogenen GLP-1 25 stimulieren, Mittel, die die Freisetzung von GLP-1 stimulieren und ihrer pharmakologischen Salze, verabreicht wird.
5. Eine Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel aus der Gruppe, bestehend aus GIP-1, GIP-1 Agonisten, GIP-1 30 Derivaten, Agonisten des GIP-1 Rezeptors, Agonisten der GIP-1 Signal Transduktionskaskade, Mittel, die die Synthese endogenen GIP-1 stimulieren, Mittel, die die Freisetzung von GIP-1 stimulieren und ihre pharmakologischen Salze, ausgewählt wird.
6. Eine Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel aus der Gruppe, bestehend aus Exendin-4 und Exendin-4 Agonisten und Exendin-4 Derivate und ihrer pharmakologischen Salze, ausgewählt wird.
7. Eine Methode nach Anspruch 4, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass der Zustand mit gestörtem Kohlehydratstoffwechsel aus der Gruppe Diabetes mellitus Typ 1 und 2, MODY, Gestationsdiabetes und sekundärer Diabetes ausgewählt ist.
8. Eine Methode nach Anspruch 4, 5, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel parenteral verabreicht wird.
9. Eine Methode nach Anpruch 8, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel intravenös verabreicht wird.
10. Eine Methode nach Anpruch 9, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel subkutan verabreicht wird.
11. Eine Methode nach Anpruch 10, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel transdermal verabreicht wird.
12. Eine Methode nach Anpruch 11, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel intramuskulär verabreicht wird.
13. Eine Methode nach Anpruch 12, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel buccal verabreicht wird.
14. Eine Methode nach Anpruch 13, dadurch gekennzeichnet, dass das Mittel sublingual verabreicht wird.
15. Eine Methode nach Anpruch 9, 10, 11 und 12, da-

durch gekennzeichnet, dass das Mittel kontinuierlich verabreicht wird.

16. Eine Methode nach Anspruch 4, 5, 6 und 7, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel oral verabreicht wird.
17. Eine Methode nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmazeutische Zubereitung aus der Gruppe, bestehend aus einer Tablette, einer Pille, einem Dragee, einer Kapsel oder einem Granulum, ausgewählt wird.
18. Eine Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass GLP-1 in einer Dosis von 1 bis 50 pmol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht wird oder in einer Dosis von 0,1 bis 50 nmol/kg Körpergewicht/Minute subkutan.
19. Eine Methode nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass GIP in einer Dosierung von 1 bis 50 pmol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht wird oder in einer Dosis von 0,1 bis 50 nmol/kg Körpergewicht/Minute subkutan.
20. Eine Methode nach Anspruch 6, dadurch gekennzeichnet, dass Exendin-4 in einer Dosierung von 50 bis 500 nmol/kg Körpergewicht/Minute intravenös verabreicht wird oder in einer Dosis von 5 bis 500 microM/kg Körpergewicht/Minute subkutan.
21. Eine Methode nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel auch partielle Anagonisten des GLP-1 Rezeptors oder der GLP-1 Rezeptor Signaltransduktionskaskade enthält.
22. Eine Methode nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmazeutische Mittel auch partielle Anagonisten des GIP-1 Rezeptors oder der GIP-1 Rezeptor Signaltransduktionskaskade enthält.
23. Eine Methode nach Anspruch 4, 5 und 6, dadurch gekennzeichnet, dass das pharmakologische Mittel ein Kombinationspräparat bestehend aus GLP-1, GIP und Exendin-4 ist.
24. Eine Methode nach Anspruch 23, dadurch gekennzeichnet, dass die pharmakologischen Mittel aus der Gruppe, bestehend aus bestehend aus GLP-1, GLP-1 Agonisten, GLP-1 Derivaten, Agonisten des GLP-1 Rezeptors, Agonisten der GLP-1 Signal Transduktionskaskade, Mittel, die die Synthese endogenen GLP-1 stimulieren, Mittel, die die Freisetzung von GLP-1 stimulieren und ihrer pharmakologischen Salze, und GIP-1, GIP-1 Agonisten, GIP-1 Derivaten, Agonisten des GIP-1 Rezeptors, Agonisten der GIP-1 Signal Transduktionskaskade, Mittel, die die Synthese endogenen GIP-1 stimulieren, Mittel, die die Freisetzung von GIP-1 stimulieren und ihre pharmakologischen Salze sowie Exendin-4 und Exendin-4 Agonisten und Exendin-4 Derivate und ihrer pharmakologischen Salze, ausgewählt wird.
25. Eine Methode nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, dass das Kombinationspräparat eine Methode nach Anspruch 8 bis 18 ist.
26. Die Verwendung der Methode nach Anspruch 1–25, mit dem Ziel, dass der Glukosestoffwechsel normalisiert wird.
27. Die Verwendung der Methode nach Anspruch 1–25, mit dem Ziel, dass der Lipidstoffwechsel normalisiert wird.
28. Die Verwendung der Methode nach Anspruch 1–27, im Stadium der gestörten Glukosetoleranz.
29. Die Verwendung der Methode nach Anspruch 1–28, dadurch gekennzeichnet, dass die Methode im Zustand der Insulinresistenz nach chirurgischen Eingriffen oder Myokardinfarkt angewandt wird.



30. Eine Methode  $\beta$ -Zell-spezifische Aktivierungs-Ef-  
fektoren der PKB/Akt zu isolieren, indem die prolifera-  
tive Aktivität pharmakologischer Stoffe in Zell-Proli-  
ferationsversuchen gemessen werden.

31. Eine Methode nach Anspruch 30, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass die anti-apoptotische Aktivität pharma-  
kologischer Stoffe gemessen wird.<sup>5</sup>

32. Eine Methode nach Anspruch 30 und 31, dadurch  
gekennzeichnet, dass die Zellen INS-1 Zellen, HIT-  
Zellen,  $\beta$ -TC-Zellen oder RINmF5-Zellen darstellen.<sup>10</sup>

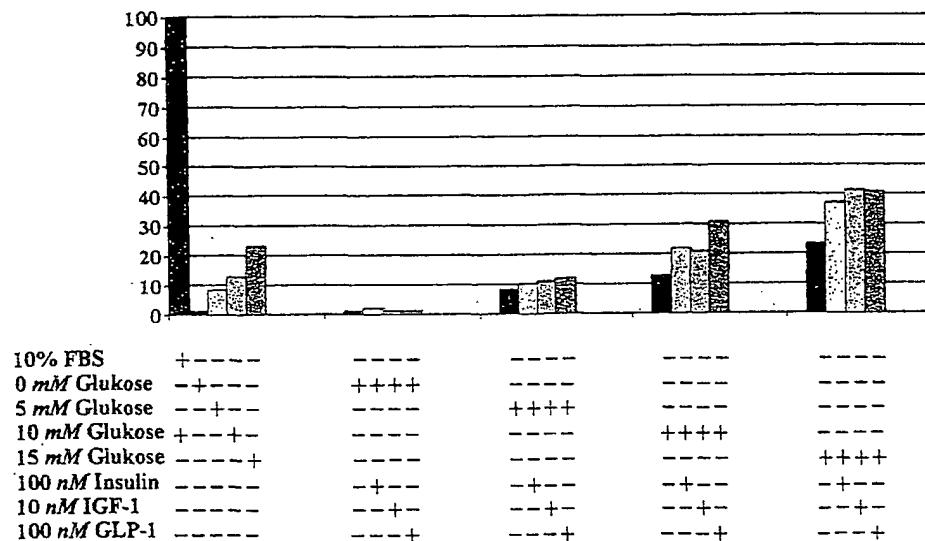
33. Eine Methode nach Anspruch 32, dadurch gekenn-  
zeichnet, dass die Zellen isolierte Inselzellen darstel-  
len.

---

Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

---

Abbildung 1. Metabolische Aktivität in INS-1 Zellen



**Abbildung 2. Zeitverlauf der PKB/Akt Aktivierung in INS-1 Zellen durch GLP-1, Insulin und IGF-1**

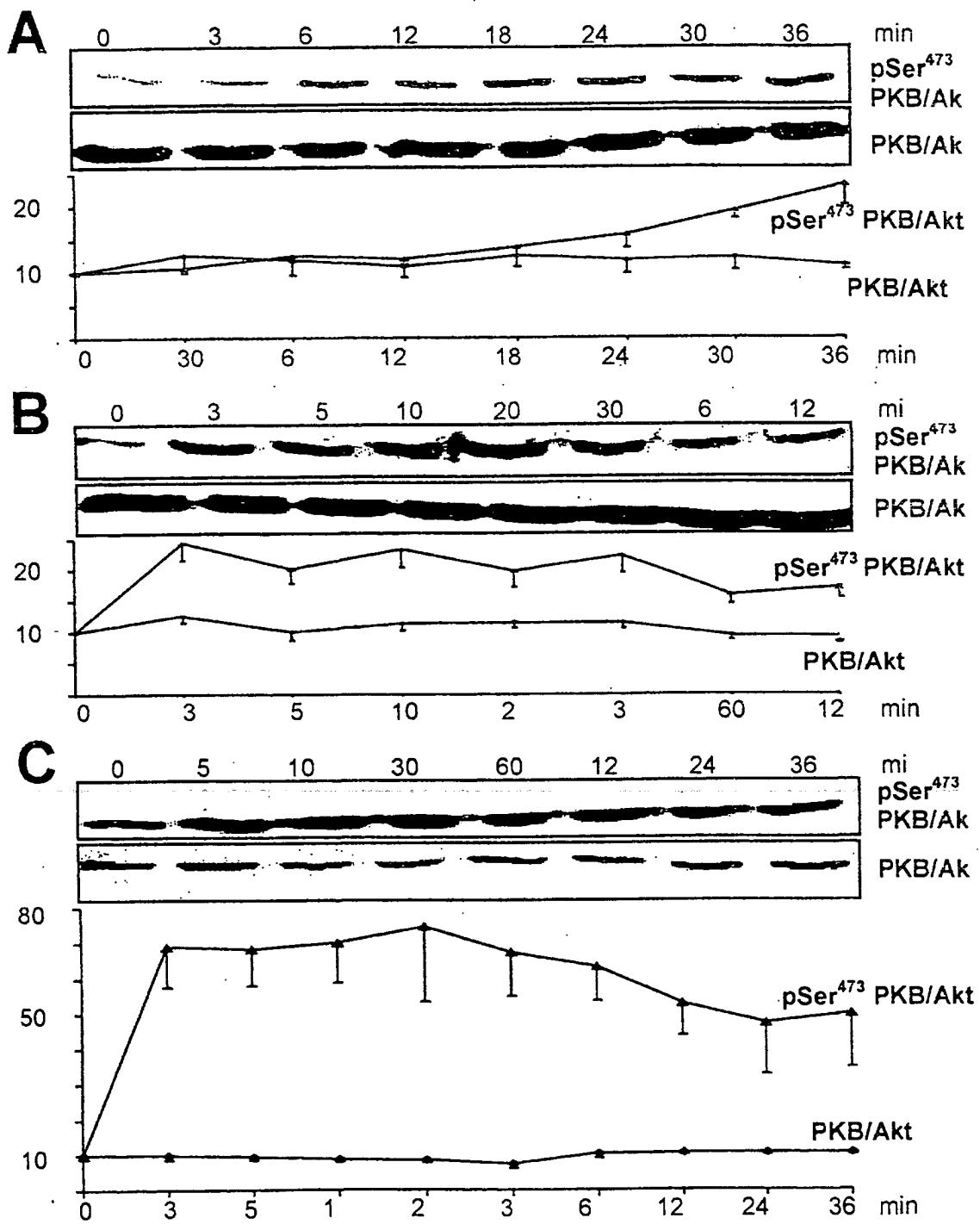
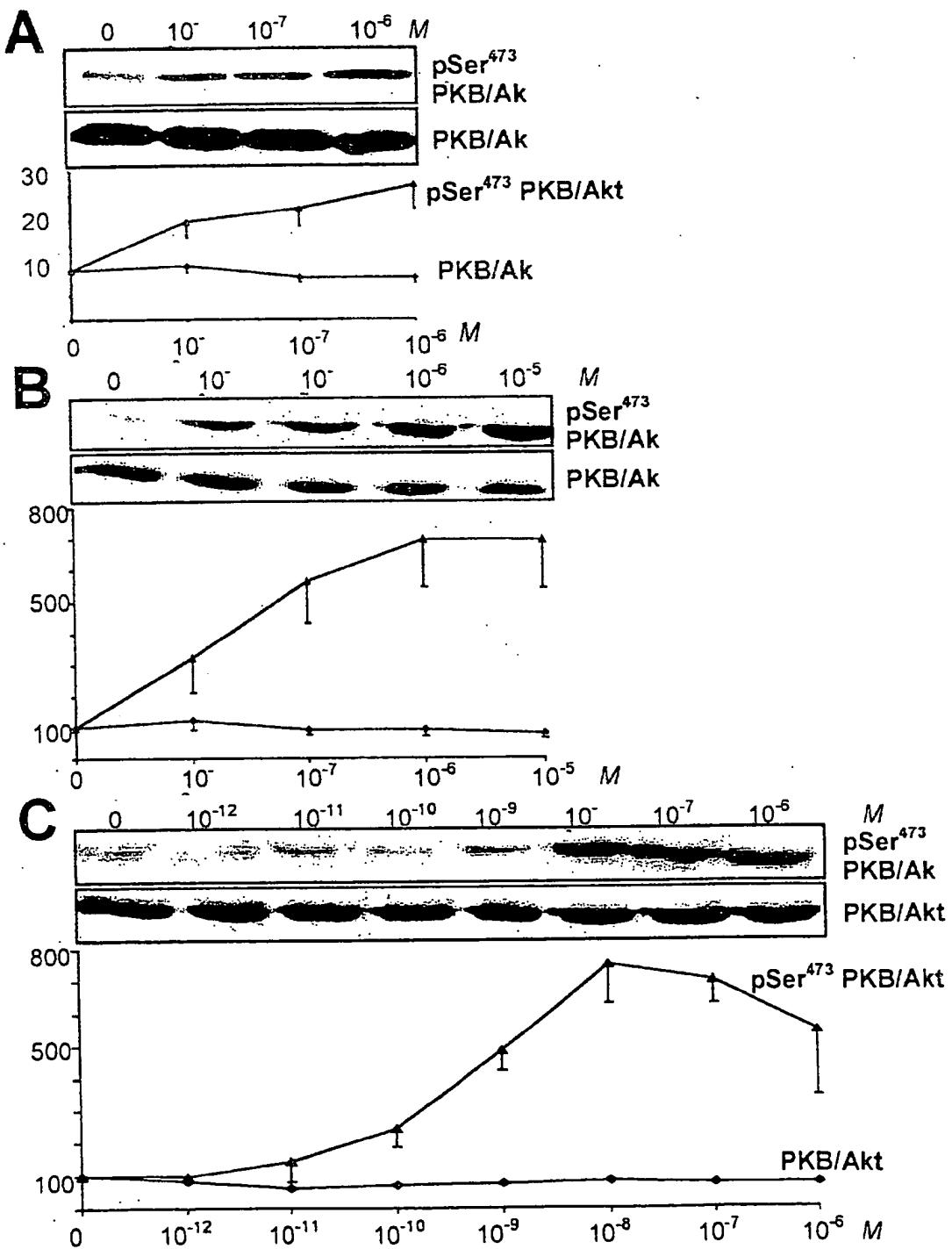
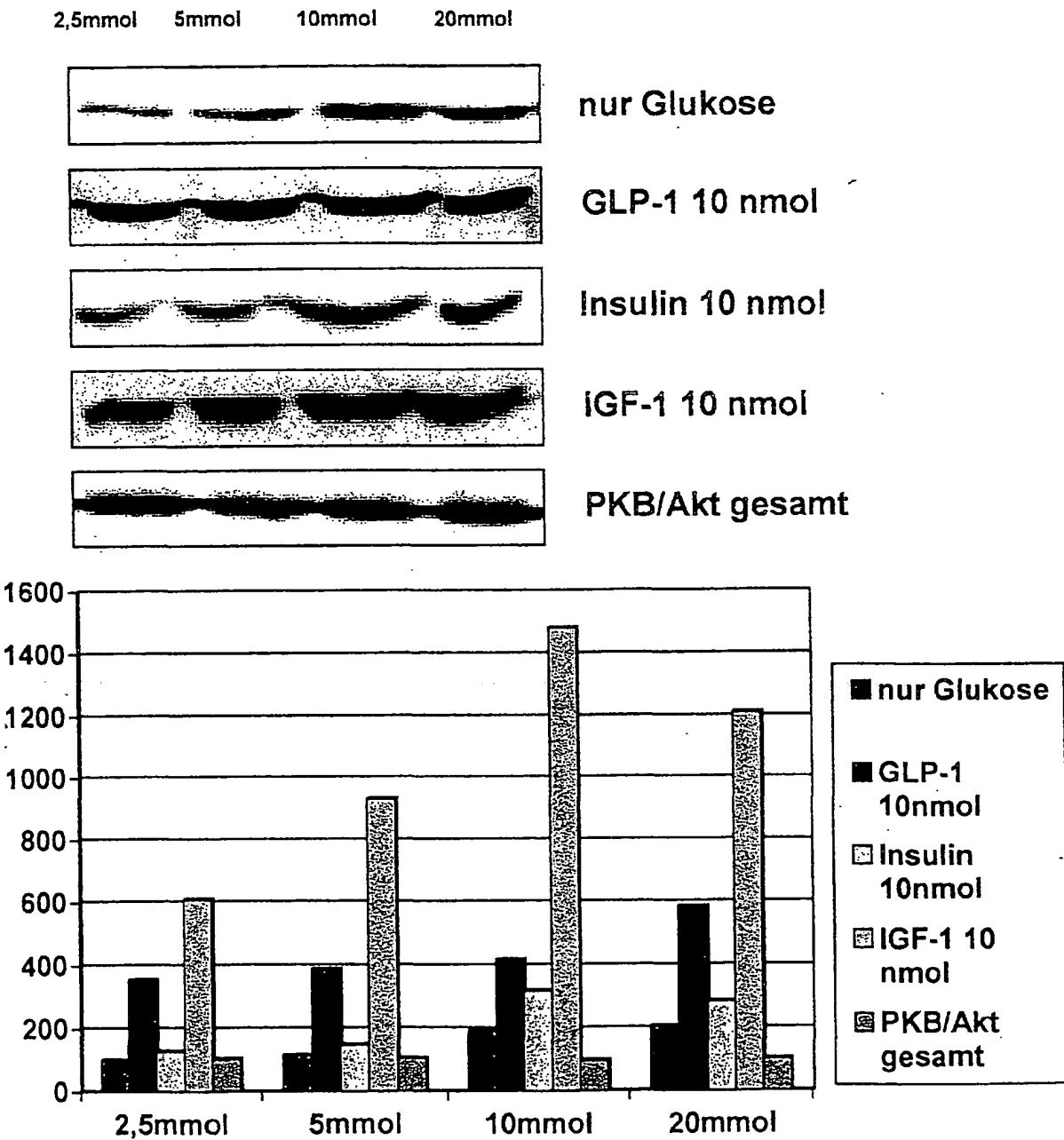


Abbildung 3. Dosis-Wirkungskurve der PKB/Akt Aktivierung in  
INS-1 Zellen durch GLP-1, Insulin und IGF-1



**Abbildung 4. Glukoseabhängigkeit der PKB/Akt Aktivierung in INS-1 Zellen durch GLP-1, Insulin und IGF-1**



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**